

Deteksi *Vibrio harveyi* dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR)



© BSN 2014

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip umum.....	2
4 Peralatan	2
5 Bahan	2
6 Prosedur kerja	3
7 Interpretasi hasil	5
8 Jaminan mutu	5
Lampiran A (informatif) Pembuatan larutan.....	6
Lampiran B (informatif) Diagram alur ekstraksi DNA dengan lysis buffer.....	9
Bibliografi	10



Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian laboratorium uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Deteksi *Vibrio harveyi* dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR).

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis (PT) 65-07 Perikanan Budidaya dan dibahas dalam rapat konsensus pada tanggal 27 Agustus 2013 di Bogor yang dihadiri oleh anggota panitia teknis, unsur pemerintah, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keakuratan hasil uji dengan memperhatikan:

1. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER. 19/Men/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan.
2. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. Kep. 01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep. 06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep. 21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep. 03/Men/2010 tentang Daftar Hama Penyakit Ikan Karantina.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 8 November 2013 sampai dengan 6 Januari 2014 dengan hasil akhir RASNI.

Deteksi *Vibrio harveyi* dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *Vibrio harveyi* pada larva udang penaeid dan media pemeliharaannya dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR).

2 Istilah dan definisi

Untuk tujuan dan penggunaan dalam dokumen ini, istilah dan definisi berikut digunakan.

2.1

aliquot

pembagian menjadi beberapa ukuran yang lebih kecil agar memudahkan pemakaian dan mencegah dari kemungkinan kontaminasi

2.2

amplifikasi

pelipatgandaan bagian tertentu dari *deoxyribo nucleic acid* (DNA) bakteri dengan bantuan reaksi enzim *polymerase*

2.3

annealing

proses penempelan primer pada DNA untai tunggal yang komplementer

2.4

denaturasi

pemisahan DNA target dari untai ganda menjadi untai tunggal

2.5

deoxyribo nucleic acid (DNA)

materi genetik yang tersusun atas nukleotida dengan gula deoksiribosa, gugus fosfat, dan basa nitrogen (guanin, adenin, sitosin, timin)

2.6

ekstraksi

proses pemisahan materi genetik dari koloni/kultur bakteri atau larva udang

2.7

ekstensi

proses pemanjangan primer dengan bantuan enzim DNA *polymerase*, sehingga akan terbentuk 2 buah DNA untai tunggal

2.8

elektroforesis

proses pemisahan DNA hasil amplifikasi berdasarkan berat molekul dalam medan listrik

2.9

PCR

reaksi berantai polimerase, merupakan perbanyakan untai DNA panjang tertentu secara *invitro* menggunakan enzim polimerase

2.10

template

DNA hasil ekstraksi yang digunakan sebagai cetakan untuk proses amplifikasi

2.11

Vibrio harveyi

bakteri penyebab penyakit kunang-kunang yang menyerang larva udang

3 Prinsip umum

Prinsip dari metode ini adalah mengisolasi dan memurnikan DNA *Vibrio harveyi* dari air dan larva udang untuk diamplifikasi.

4 Peralatan

- a) *autoclave*;
- b) cawan petri;
- c) *centrifuge* (minimal 12 000 r/min);
- d) *dissecting set*;
- e) *freezer* (suhu -20 °C);
- f) jarum Ose;
- g) lampu bunsen;
- h) *laminar air flow cabinet*;
- i) *microwave* atau *hot plate magnetic stirrer*;
- j) mikropipet berbagai ukuran 0,2 µl - 1 000 µl;
- k) *mini mixer*;
- l) 1 set alat dokumentasi gel;
- m) 1 set alat elektroforesis gel agarosa;
- n) *thermal cycler*;
- o) timbangan analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- p) *uv transilluminator*;
- q) *waterbath/heating block*.

5 Bahan

- a) agarosa;
- b) akuabides;
- c) 0,5 x bufer *Tris Boric* EDTA (TBE);
- d) bufer TE (100 mM tris-HCl, 10 mM *ethylene diamine tetra acetyc acid*/EDTA);
- e) *dNTPmix*;
- f) etanol absolut p.a;
- g) *ethidium bromide* (C₂₁H₂₀N₃Br) atau pewarna DNA lainnya;
- h) *lysis buffer*;
- i) 6 x *loading dye*;
- j) *marker DNA* (100 bp *DNA ladder*);
- k) *microtip*, ukuran 10 µl – 1 000 µl;
- l) tabung mikro, ukuran 200 µl, 1 500 µl;
- m) MgCl₂;
- n) 10 x bufer PCR ;
- o) penggerus jaringan (*pellet pestle*);
- p) primer :
 - VH1 F: 5'-ACC GAG TTA TCT GAA CCT TC-3'

- VH2 R: 5'-GCA GCT ATT AAC TAT ACT ACT-3'
- q) *proteinase K* (10 mg/ml);
- r) *sodium dodecyl sulfat* (SDS);
- s) *sodium asetat* ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$);
- t) *Thiosulphate citrate bile-salt sucrose agar* (TCBSA);
- u) *Taq DNA polymerase* (5 unit/ μl).

6 Prosedur kerja

6.1 Preparasi contoh uji

Contoh uji berupa air atau larva udang dengan atau tanpa melalui proses kultur.

6.2 Kultur bakteri dari contoh uji

- a) siapkan media TCBSA;
- b) inokulasikan contoh air atau gerusan larva udang secara aseptis pada media TCBSA;
- c) inkubasikan pada 35°C – 37°C selama 18 jam - 24 jam.

6.3 Ekstraksi DNA dengan *lysis buffer*

- a) masukkan 20 mg gerusan larva udang atau 1 koloni bakteri yang diduga sebagai *Vibrio harveyi* ke dalam tabung mikro 1 500 μl ;
- b) tambahkan 500 μl *lysis buffer* dan homogenkan;
- c) inkubasikan pada 95°C selama 10 menit menggunakan *heating block* atau *water bath*;
- d) sentrifugasi pada $12\,000 \times g$ selama 10 menit;
- e) pindahkan 200 μl cairan jernih pada bagian atas ke dalam tabung mikro 1 500 μl baru yang telah diisi dengan 400 μl etanol absolut p.a dan 20 μl sodium asetat;
- f) homogenkan, kemudian sentrifugasi pada $12\,000 \times g$ selama 5 menit;
- g) buang supernatan dan keringkan pelet DNA;
- h) larutkan pelet DNA dengan 100 μl – 200 μl akuabides atau bufer TE.
- i) ukur konsentrasi DNA dengan alat pengukur konsentrasi asam nukleat pada panjang gelombang 260 nm (\AA_{260});
- j) lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan;
- k) periksa kemurnian DNA dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm ($\text{\AA}_{260}/\text{\AA}_{280}$).

CATATAN Diagram alur ekstraksi DNA digambarkan pada Lampiran B.

6.4 Amplifikasi

- a) cairkan (*thawing*) bahan *cocktail* PCR dan DNA *template*, letakkan di atas es.
- b) buat preparasi *cocktail* sesuai dengan tabel 1 atau tabel 2, siapkan volume *cocktail* 10% lebih banyak dari yang dibutuhkan.
- c) homogenkan semua bahan *cocktail* dan distribusikan sebanyak 24 μl ke masing-masing tabung mikro 200 μl .
- d) tambahkan 1 μl DNA *template* contoh uji (10 ng -100 ng), sertakan contoh kontrol positif dan kontrol negatif.
- e) panaskan pada suhu 42°C selama 30 menit.
- f) lakukan amplifikasi dengan PCR sesuai tabel 3.

Tabel 1 - Komposisi bahan *cocktail* PCR

Komposisi	Volume (μl)	Konsentrasi akhir
akuabides	18,375	
bufer PCR 10 x	2,50	1 x
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	1,5 mM
dNTPmix (10 mM)	0,5	200 μM
primer VH1 F (10 μM)	0,5	0,2 μM
primer VH2 R (10 μM)	0,5	0,2 μM
Taq DNA polymerase (5 U/ μl)	0,125	0,625 U
DNA template	1,00	10 ng - 100 ng
Total	25	

Tabel 2 - Komposisi bahan *cocktail* PCR dengan komersial mastermix

Komposisi	Volume (μl)	Konsentrasi akhir
akuabides	10,5	
mastermix 2 x	12,5	1 x
primer VH1F (10 μM)	0,5	0,2 μM
primer VH2 R (10 μM)	0,5	0,2 μM
DNA template	1	10 ng - 100 ng
Total	25	

Tabel 3 – Program amplifikasi

Proses	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
Hot start	95	5 menit	
Denaturasi	94	45 detik	30 x
Annealing	55	45 detik	
Ekstensi	72	90 detik	
Ekstensi akhir	4	minimal 10 menit	

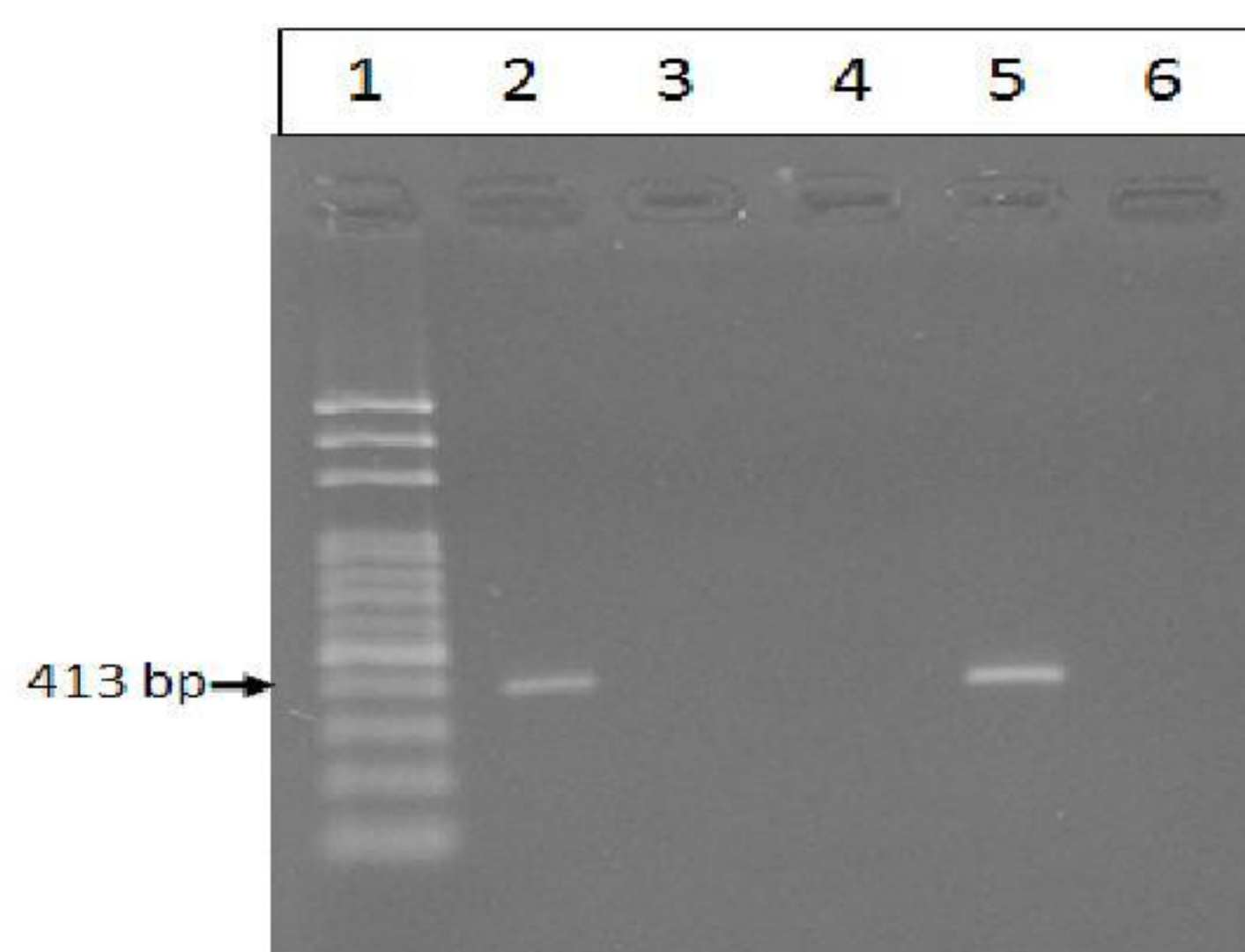
6.5 Elektroforesis

- letakkan 1,5% gel agarosa ke elektroforesis *chamber*.
- tambahkan larutan TBE 0,5 x ke dalam elektroforesis *chamber* hingga gel agarosa terendam.
- siapkan 2 μl *loading buffer* di atas parafilm sesuai jumlah contoh dan 1 *marker*.
- ambil contoh uji hasil PCR sebanyak 10 μl dan campur dengan *loading buffer*.
- masukkan ke dalam sumur dengan menggunakan *micropipet* disertakan juga *marker* DNA sebanyak 2 μl.
- setelah semua contoh uji disuntikkan, pasang tutup elektroforesis *chamber* dan hidupkan listrik dengan voltase diatur 120 V.
- hentikan elektroforesis setelah pewarna *bromphenol blue* mencapai 2/3 bagian panjang gel agarosa.
- rendam gel agarosa dalam larutan *ethidium bromide* (0,5 μg/ml) selama 10 menit.
- rendam gel agarosa dalam akuades selama 10 menit.
- amati hasil elektroforesis dengan UV *transilluminator* dan dokumentasikan.

7 Interpretasi hasil

Berdasarkan pola pita pada gel agarosa setelah proses elektroforesis terhadap produk PCR yang diamati dengan UV *transilluminator*, maka:

- kontrol positif (DNA *V. harveyi*): terlihat adanya pita berukuran 413 bp;
- kontrol negatif (blanko/akuabides): tidak terlihat adanya pita berukuran 413 bp;
- kontrol negatif (DNA selain *V. harveyi*): tidak terlihat adanya pita berukuran 413 bp;
- contoh uji positif *V. Harveyi*: terlihat adanya pita berukuran 413 bp;
- contoh uji negatif *V. harveyi*: tidak terlihat adanya pita berukuran 413 bp.



Keterangan gambar:

- 1 : Marker (100 bp DNA Ladder)
- 2 : Kontrol positif (DNA positif *V. harveyi*)
- 3 : Kontrol negatif (blanko/akuabides)
- 4 : Kontrol negatif (DNA selain *V. harveyi*)
- 5 : Contoh uji terdeteksi *V. harveyi*
- 6 : Contoh uji tidak terdeteksi *V. harveyi*

Gambar 1 - Hasil deteksi *V. harveyi* dengan metode PCR

8 Jaminan mutu

- a) hasil ekstraksi DNA mempunyai rasio $\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$ berkisar 1,8 - 2,0;
- b) proses amplifikasi dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif dan 2 kontrol negatif menunjukkan hasil yang konsisten.

Lampiran A (informatif) Pembuatan larutan

A.1 Larutan Tris- HCl 0,5 M

Cara membuat :

- a) larutkan 121,1 g *Tris base* dalam 800 ml akuades;
- b) tambahkan 70 ml atau 42 ml HCl pekat untuk mendapatkan pH 7,4 atau 8,0;
- c) biarkan larutan dingin pada 25 °C – 30 °C sebelum pengaturan pH terakhir;
- d) tambahkan akuades hingga 1 l;
- e) *aliquot* dalam beberapa botol;
- f) sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada 121 °C.

A.2 Larutan NaCl 5 M

Cara membuat:

- a) larutkan 292 g NaCl dalam 800 ml akuades;
- b) tambahkan akuades sampai 1 l;
- c) *aliquot* dalam beberapa botol;
- d) sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada 121 °C.

A.3 Larutan CaCl₂ 2,5 M

Cara membuat:

- a) larutkan 11 g CaCl₂.6H₂O dalam akuades hingga volumenya 20 ml;
- b) saring larutan dengan filter 0,22 µm;
- c) *aliquot* 1 ml dan simpan pada 4 °C.

A.4 Larutan Proteinase K 10 mg/ml

Cara membuat:

- a) larutkan 100 mg proteinase K ke dalam larutan steril 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) dan 5 mM CaCl₂ hingga volumenya 10 ml (campur 8 880 µl akuades, 1 ml 0,5 M Tris-HCl pH 7,4 dan 20 µl 2,5 M CaCl₂);
- b) *aliquot* 1 ml dan simpan pada -20 °C.

A.5 Larutan *disodium ethylene diamine tetra acetate* (Na-EDTA) 0,5 M pH 8

Cara membuat:

- a) tambahkan 186,1 g Na-EDTA.2H₂O dalam 800 ml akuades.
- b) homogenkan dengan *magnetic stirrer*.
- c) tambahkan NaOH secara bertahap sambil dihomogenkan (± 20 g NaOH) hingga mencapai pH 8.
- d) *aliquot* dan sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada 121 °C.

A.6 Larutan sodium dodecyl sulphate (SDS) 10%

Cara membuat :

- larutkan 100 g SDS *electrophoresis grade* ke dalam 900 ml akuades;
- panaskan pada 68 °C untuk melarutkan SDS;
- tambahkan beberapa tetes HCl pekat hingga mencapai pH 7,2;
- tambahkan akuades hingga 1 liter;
- aliquot* dan sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada 121 °C.

A.7 Larutan ethidium bromide 0,5 µg/ml

Cara membuat :

- tambahkan 5 µl larutan *ethidium bromide* 10 mg/ml ke dalam 100 ml bufer TBE;
- simpan di tempat yang gelap agar larutan *ethidium bromide* lebih awet .

A.8 Larutan sodium asetat 3 M pH 5,2

Cara membuat :

- larutkan 408,1 g sodium asetat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) dalam 800 ml akuades;
- tambahkan asam asetat glasial hingga mencapai pH 5,2;
- tambahkan akuades sampai 1 liter;
- aliquot* dan sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada 121 °C.

A.9 bufer TBE 5x

Cara membuat:

- masukkan 800 ml akuades ke dalam *beaker* berkapasitas 1 liter;
- masukkan 54 g *Tris base* dan 27,5 g asam borat ke dalam *beaker glass* yang telah berisi akuades dan aduk dengan *magnetic stirrer* sampai larut;
- tambahkan 20 ml EDTA 0,5 M, homogenkan;
- tambahkan akuades sampai 1 liter;
- aliquot* dan sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada 121 °C.

A.10 Gel agarosa 1,5%

Cara membuat :

- larutkan 1,5 g agarosa dalam 100 ml bufer TBE 0,5 x;
- didihkan hingga larutan menjadi bening;
- tuangkan larutan agarosa pada cetakan, setelah suhunya mencapai sekitar 60 °C.

A.11 Lysis buffer

Cara membuat :

- campurkan 69,7 ml akuades; 10 ml Tris-HCl 0,5 M pH 8,0; 200 µl EDTA 0,5 M pH 8,0; 10 ml NaCl 5 M; dan 10 ml SDS 10%;
- tambahkan 100 µl Proteinase K 10 mg/ml sesaat sebelum digunakan, untuk mendapatkan larutan dengan kadar akhir Tris-HCl 50 mM; EDTA 1 mM, NaCl 500 mM, SDS 1%, dan *Proteinase K* 10 µg/ml.

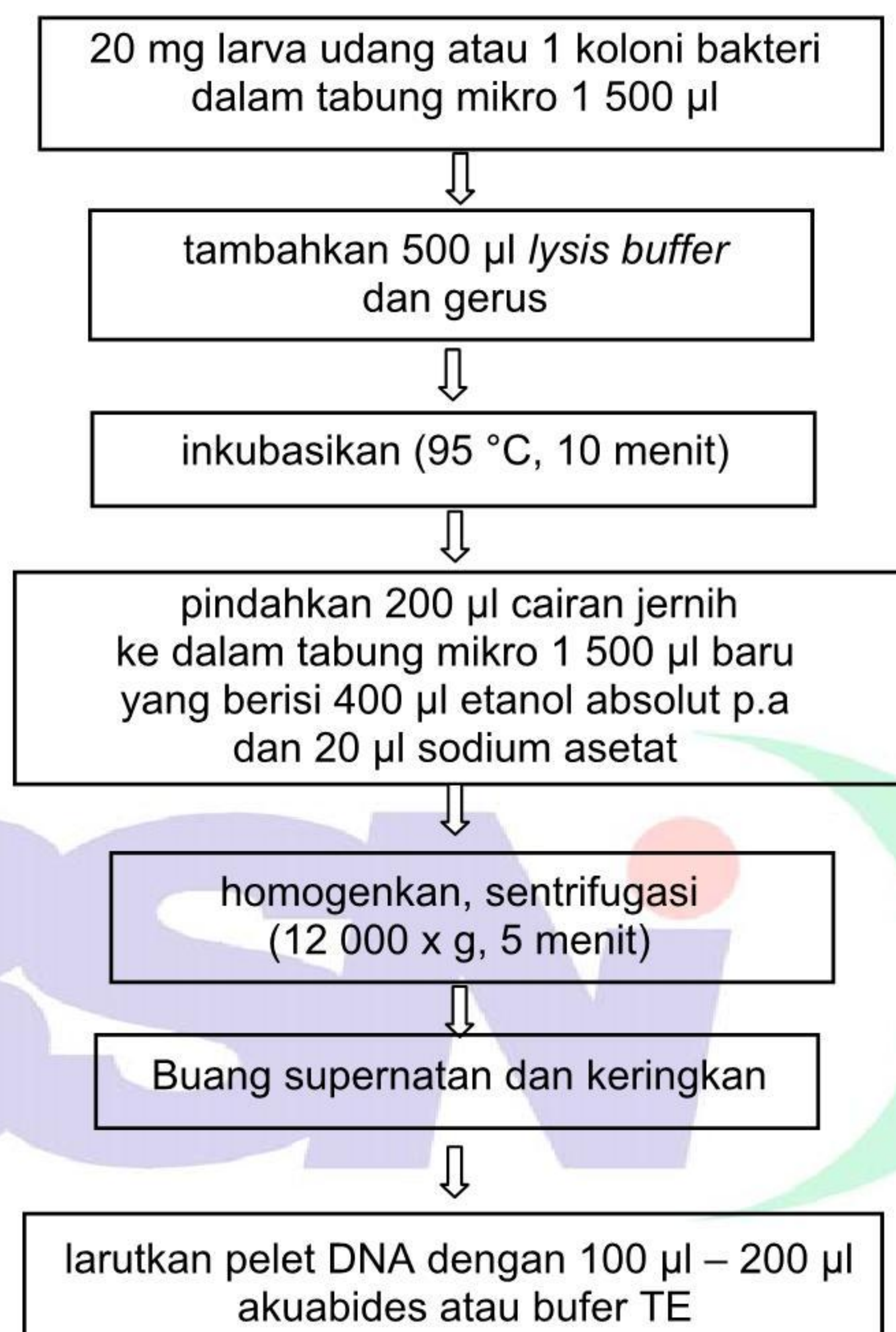
A.12 Thiosulphate citrate bile-salt sucrose agar (TCBSA)

Cara membuat :

- a) Larutkan 0,075 g KCl, 0,694 g MgSO_4 , 1,84 g NaCl dan 88 g TCBSA dalam 1 l akuades, kemudian didihkan.
- b) Tuang dalam cawan petri setelah suhunya mencapai sekitar 60 °C.



Lampiran B
(informatif)
Diagram alur ekstraksi DNA dengan *lysis buffer*



Bibliografi

Chari, P.V.B. & S.K. Dubey, 2006. *Rapid and specific detection of luminous and non-luminous isolates by PCR amplification. Current Science* 90 (8): 1105 – 1108.

Sambrook, J. & D.W. Russel. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press. New York

SNI-01-2332.4-2006. Cara Uji Mikrobiologi – Bagian 4 : Penentuan *Vibrio cholerae* pada produk perikanan.

SNI-01-2332.5-2006. Cara Uji Mikrobiologi – Bagian 5 : Penentuan *Vibrio parahaemolyticus* pada produk perikanan

